

Obtenção *in vitro* do teleomorfo de *Cylindrocarpon destructans*, *Neonectria radicola*

Rego, C.^{1,3}; Cabral, A.²; Nascimento, T.¹; Oliveira, H.²

¹Laboratório de Patologia Vegetal "Veríssimo de Almeida", Tapada da Ajuda,
1349-017 Lisboa; crego@isa.utl.pt

²Instituto Superior de Agronomia, Departamento de Protecção das Plantas e de
Fitoecologia, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa

Resumo

O pé-negro da videira é uma importante doença que origina enegrecimento da zona basal da planta, conduzindo ao declínio precoce e à morte de videiras jovens. A esta doença têm sido atribuídos como agentes causais as espécies *Cylindrocarpon destructans* e *C. obtusisporum*, embora em Portugal apenas a primeira espécie tenha sido isolada. *Neonectria radicola* (teleomorfo de *C. destructans*) é um Ascomycota que forma peritecas sobre o hospedeiro, embora tais estruturas ainda não tenham sido observadas no País, em videira. Existe controvérsia quanto ao comportamento sexual do fungo, sendo referenciado, por uns, como uma espécie homotética e, por outros, como heterotética. Na tentativa de obtenção do estado teleomórfico de *C. destructans*, utilizou-se uma colecção de 15 isolados, provenientes de diferentes regiões do País. Os cruzamentos entre isolados (120 combinações) foram realizados em placas de Petri contendo Gelose de Folha de Craveiro (CLA), sob radiação Ultra-Violeta Próximo (NUV) e temperatura de 6°C. O início da formação de peritecas ocorreu ao fim de três meses de incubação, para alguns cruzamentos. As características morfológicas e biométricas das peritecas, ascos e ascósporos foram determinadas, decorridos cinco meses de incubação. A obtenção do teleomorfo apenas foi possível por cruzamento de isolados distintos, indiciando tendência da espécie para um comportamento heterotético. Identificaram-se quatro isolados mais férteis (Cy68, Cy36, Cy76, Cy111), tendo Cy68 contribuído para a formação de peritecas em 60% dos cruzamentos, enquanto que para os restantes isolados o teleomorfo foi obtido em 33% dos cruzamentos. A identificação destes isolados irá permitir alargar o âmbito do estudo à totalidade de isolados que integram a colecção de *C. destructans*, com vista à confirmação do comportamento sexual da espécie.

Palavras-chave: Pé-negro da videira; *Cylindrocarpon destructans*; *Neonectria radicola*

Abstract

Black-foot is an important grapevine disease, caused by the fungus *Cylindrocarpon destructans*, which causes a darkening of the basal-end of the plant, leading to early decline and death of young grapevines. Both, *C. destructans* and *C. obtusisporum* are considered responsible for this disease, although only the former was isolated in Portugal. *Neonectria radicola* (teleomorph of *C. destructans*) is an Ascomycota forming perithecia on host tissue, but such structures haven't been observed yet in the country in grapevine. There is some uncertainty concerning the sexual behaviour of the fungus, some authors considering this as a homothallic species while other considered it as heterothallic. Attempting to obtain the teleomorph of *C. destructans*, a collection of 15 isolates was used, originated from different regions of the country. Crosses between isolates (120 pairs) were done in Petri dishes containing Carnation Leaf Agar (CLA), under Near-UV light (NUV) at 6°C. For some crosses, perithecia formation began after three months of incubation. After five months of incubation, morphological and biometrical traits of perithecia, asci and ascospores were evaluated. The teleomorph was only obtained when crossing distinct isolates, suggesting a tendency for an heterothallic behaviour of the species. Four isolates can be pointed out as more fertile (Cy68, Cy36, Cy76, Cy111), with Cy68 forming perithecia in 60% of crossings involving it, while the remaining produced perithecia in 33% of crosses. The identification of these isolates will allow enlarging the scope of the study to all *C. destructans* isolates under collection, aiming to confirm the sexual behaviour of this species.

Key words: Black-foot of grapevine; *Cylindrocarpon destructans*; *Neonectria radicola*.

1. Introdução

O pé-negro da videira é uma grave doença em inúmeras regiões vitícolas mundiais, constituindo actualmente uma das principais ameaças ao cultivo e produção estáveis da videira, dado afectar sobretudo vinhas jovens, com dois a oito anos de idade (Boubals, 1994; Galet, 1995; Larignon, 1999). Os estudos efectuados até à data em Portugal, sobre esta importante doença, permitem admitir ser a espécie *Cylindrocarpon destructans* (Zins.) Scholten a única, deste género, isolada quer de viveiros de porta-enxertos quer de videiras jovens, apresentando sintomas de declínio (Rego, 1994; Oliveira *et al.*, 1998; Rego *et al.*, 2000). A espécie *C. destructans* está assinalada nas mais importantes regiões vitícolas do mundo, como responsável por significativa mortalidade em vinhas recém-plantadas, nomeadamente em países como a França (Maluta & Larignon, 1991), os E.U.A. (Scheck *et al.*, 1998), a África do Sul (Fourie & Hallen, 2001), a Grécia (Rumbos & Rumbou, 2001) e a Espanha (Armengol *et al.*, 2001), onde inúmeros vitivinicultores têm sido obrigados a praticar elevado número de retanchas ou a replantar áreas consideráveis de vinha, práticas que têm vindo a comprometer a viabilidade económica dos investimentos efectuados (Scheck *et al.*, 1998; Rego *et al.*, 2000).

Para além de *C. destructans*, também a espécie *Cylindrocarpon obtusisporum* (Cooke & Harkness) Wollenweber poderá ser responsável pelo pé-negro da videira, conforme tem sido referido, entre outros, por Scheck *et al.* (1998). Taxonomicamente, estas duas espécies são muito próximas e os critérios que as separam algo difusos. Booth (1966), ao estudar fungos do género *Cylindrocarpon*, delineou quatro grupos morfológicos, baseando-se na presença ou ausência de microconídios e/ou produção de clamidósporos miceliais em cultura. Com base nesse estudo, produziu uma chave dicotómica simples para a identificação de espécies deste género, mas não esclareceu dúvidas existentes na identificação de espécies tão próximas quanto as acima referidas. Também Samuels & Brayford (1990) consideram essa chave não natural, visto espécies muito próximas serem colocadas em grupos diferentes. Afigura-se, por conseguinte, fundamental o estudo dos holomorfos destes fungos (estados anamórfico e teleomórfico), com vista ao esclarecimento de relações taxonómicas existentes entre estas duas espécies (ou variantes de uma mesma espécie).

O teleomorfo de *C. destructans* foi pela primeira vez descrito, por Gerlach & Nilson (1963), em *Cyclamen persicum* L., tendo sido designado por *Nectria radicolola*. Em 1999, o género *Nectria sensu lato* foi revisto taxonomicamente, tendo sido limitado a um grupo de espécies, isto é, *Nectria sensu stricto*, com características morfológicas e anatómicas bem definidas e homogéneas, de entre as quais se destacam, a formação de peritecas vermelhas e anamorfos pertencentes ao género *Tubercularia*. No género *Neonectria* foram incluídas as espécies cujas peritecas eram distintas morfológica e anatomicamente das de *Nectria sensu stricto* e cujos anamorfos pertenciam ao género *Cylindrocarpon* (Rossman *et al.*, 1999). Mais recentemente, Schoch *et al.* (2000) provaram que o género *Neonectria* é verdadeiramente monofilético, com base na amplificação de uma região correspondente ao gene do ribossoma 5,8S, bem como das regiões ITS1 (Espaçador Internamente Transcrito) e ITS2 que o flanqueiam, e ainda da extremidade 5' do gene da β -tubulina. Semelhantes resultados foram obtidos por Mantiri *et al.* (2001), quando analisaram as sequências da sub-unidade menor de rDNA mitocondrial (mtSSU) em combinação com o estudo das características fenotípicas observadas. De acordo com esta revisão taxonómica, o teleomorfo de *C. destructans* passou a designar-se *Neonectria radicolola* (Gerlach & Nilsson) Mantiri & Samuels. Caracteriza-se por apresentar peritecas isoladas a densamente agregadas, formando-se

geralmente na periferia de pequenos cancros no tecido do hospedeiro. São superficiais, não estromáticas e fáceis de remover do substrato ou então encontram-se localizadas na superfície de um minúsculo e quase imperceptível estroma. A sua forma é geralmente piriforme a sub-globosa, de cor vermelha a vermelha-acastanhada, podem ser não papiladas ou apresentar uma minúscula papila cónica, são lisas ou verrugosas (Booth, 1967; Samuels & Brayford, 1990; Larignon, 1999). Os ascos são cilíndricos a sub-clavados, parafisados e contêm oito ou raramente quatro a seis ascósporos (Booth, 1967; Samuels & Brayford, 1990). Os ascósporos são elipsóides a subfusóides, hialinos, unisseptados não apresentando constrição no septo, regulares, raramente equinulados, parcial ou completamente bisseriados e preenchem completamente os ascos (Booth, 1967; Samuels & Brayford, 1990; Larignon, 1999). Relativamente a *C. obtusisporum*, ainda subsistem dúvidas quanto à identidade do teleomorfo (*Nectria tawa* Dingley), conforme é salientado por Samuels & Brayford (1990).

O objectivo do presente trabalho foi a tentativa de indução *in vitro* do teleomorfo de *C. destructans*, uma vez que o fungo apenas tem sido observado em Portugal no seu estado anamórfico.

2. Material e Métodos

Os isolados de *C. destructans* utilizados neste estudo foram obtidos de material vitícola nacional (porta-enxertos de videira e videiras jovens) com sintomas de pé-negro, e pertencem à colecção de isolados portugueses mantidos na micoteca do Laboratório de Patologia Vegetal “Veríssimo de Almeida” em tubos de ensaio, contendo meio gelosado inclinado “Spezieller Nährstoffarmer Agar” adicionado de 0,1% de extracto de levedura (SNAY), à temperatura de 5°C e em condições de obscuridade (Brayford, 1992). Para a realização dos estudos efectuados, os isolados foram repicados para placas de Petri de poliestireno com 90 mm de diâmetro, contendo 20 ml de Gelose de Batata Dextrosada (PDA, Difco Laboratories, Detroit, MI, E.U.A.). A origem dos isolados, relativamente ao hospedeiro, local e data de colheita, assim como a designação que lhes foi atribuída no presente trabalho encontra-se referida no Quadro 1.

Na tentativa de obtenção do teleomorfo de *C. destructans*, utilizou-se uma adaptação do método descrito por Crous *et al.* (1993) para testar a compatibilidade sexual entre isolados de *Cylindrocladium*. Os cruzamentos entre isolados foram realizados em placas contendo Gelose de Folha de Craveiro (CLA) (Tio *et al.*, 1977) e, como inóculo, repicaram-se cilindros de gelose (3 mm de diâmetro) retirados da periferia de colónias, incubadas anteriormente em PDA, na obscuridade a 20°C±1°C, durante 10 dias, de forma a promover o crescimento da cultura. Para todos os cruzamentos, colocaram-se, de cada lado do pedaço de folha de craveiro, dois isolados distintos de *C. destructans*, em posição oposta. As placas foram seladas com “Parafilm” e incubadas na obscuridade a 20°C±1°C, durante 10 dias, de forma a promover o crescimento micelial. Posteriormente, foram colocadas sob acção de radiação emitida por lâmpadas tubulares Ultra-Violeta Próximo (NUV) “Phillips TL 8W/05”, mantendo-se a temperatura de incubação (20°C±1°C). Num segundo ensaio, seguiu-se procedimento idêntico, mas alterou-se a temperatura de 20°C±1°C para 6°C±1°C. As culturas foram observadas regularmente com o auxílio de uma lupa binocular (ampliação de 20×), para pesquisa de formação de peritecas, durante cinco meses. Para avaliação das características biométricas das peritecas formadas, observaram-se directamente as culturas ao microscópio, utilizando uma ampliação de 100x

(microscópio Laborlux S, Leitz). A diferenciação e biometria de ascos e ascósporos foram avaliadas por esmagamento das peritecas em lâmina de vidro, em gota de azul de algodão e lactofenol, seguido de observação microscópica, utilizando uma ampliação de 400x (microscópio Laborlux S, Leitz).

Quadro 1. Origem dos isolados de *Cylindrocarpon destructans* obtidos de videira.

Isolado	Data de Colheita	Local de colheita	Porta-enxerto / Casta
Cy1 ^{a)}	1994	Runa - Torres Vedras	99 R / Seara Nova
Cy16 ^{b)}	1995	Salir do Porto - Caldas da Rainha	110 R 118 F / -
Cy18	1996	Almerim	SO4 / Fernão Pires
Cy19	1996	São Paio - Gouveia	1103 P / Malvasia Fina
Cy21	1996	São Paio - Gouveia	1103 P / Malvasia Fina
Cy24	1997	Pó - Bombarral	110 R 139 F / -
Cy27	1997	Régua	110 R / Tinta Barroca
Cy28	1997	Régua	99 R / Touriga Nacional
Cy29	1997	Régua	110 R / Tinta Francesa
Cy36	1998	Pó - Bombarral	110 R 139 F / -
Cy68	1999	Pó - Bombarral	99 R / -
Cy76	1999	Pó - Bombarral	99 R / -
Cy105	1999	Bairrada	99 R / Baga
Cy107	1999	Sangemil - Tondela	196-17 / Tinta Roriz
Cy111	1999	S. João da Pesqueira	99 R / Touriga Nacional

a) Identificação confirmada pelo "Internacional Mycological Institute" como *Cylindrocarpon destructans* (Zins.) Scholten, tendo sido atribuído o número 357400 (isolado de referência).

b) Identificação confirmada pelo "Internacional Mycological Institute" como *Cylindrocarpon* sp. cf *destructans* (Zins.) Scholten, tendo sido atribuído o número 372536.

3. Resultados e Discussão

O ensaio realizado com intuito de obter o teleomorfo de *C. destructans* revelou-se infrutífero, para todas as combinações testadas, quando a temperatura de 20°C foi mantida durante os cinco meses em que decorreu o ensaio, e apesar das culturas terem sido sujeitas a radiação NUV. Todavia, quando se baixou a temperatura de incubação de 20°C para 6°C, obtiveram-se peritecas para 19 dos 120 cruzamentos efectuados (Quadro 2). Para alguns desses cruzamentos, o início da formação de peritecas ocorreu ao fim de três meses de incubação, embora o registo final de resultados tenha sido realizado ao fim de cinco meses.

As peritecas formaram-se geralmente sobre a superfície do agar, no entanto, em alguns casos, surgiram nas folhas de craveiro. Inicialmente, apresentavam coloração alaranjada tornando-se vermelhas a acastanhadas, na maturação; eram lisas ou verrugosas, não papiladas ou com uma pequena papila cônica; globosas a obpiriformes, com um ostíolo na zona apical. Os ascos eram clavados, sesséis e com paráfises, contendo oito ascósporos agrupados obliquamente, em uma ou duas séries. Os ascósporos eram hialinos, lisos, bicelulares e sem constrição ao nível do septo, fusiformes ou elipsóides (Fig. 1).

Quadro 2. Cruzamento pareado de isolados de *Cylindrocarpon destructans* que resultaram na formação de peritecas com ascos e ascósporos (+). Os cruzamentos foram efectuados em meio de Gelose de Folha de Craveiro (CLA) e as culturas, após 10 dias de crescimento na obscuridade, à temperatura de 20°C, foram incubadas à temperatura de 6°C, sob radiação emitida por lâmpadas tubulares Ultra-Violeta Próximo (NUV), durante cinco meses.

Isolados	Cy1	Cy16	Cy18	Cy19	Cy21	Cy24	Cy27	Cy28	Cy29	Cy36	Cy68	Cy76	Cy105	Cy107	Cy111
Cy1	-														
Cy16	-	-													
Cy18	-	-	-												
Cy19	-	-	-	-											
Cy21	-	-	-	-	-										
Cy24	-	-	-	-	+	-									
Cy27	-	-	-	-	-	-	-								
Cy28	-	-	-	-	-	-	-	-							
Cy29	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
Cy36	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-					
Cy68	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-				
Cy76	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-			
Cy105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-		
Cy107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
Cy111	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-

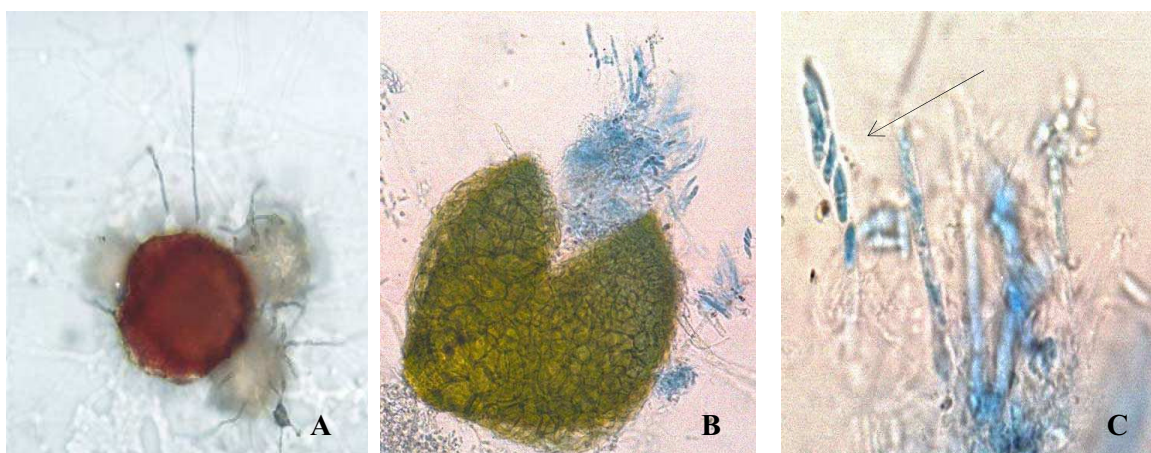


Fig. 1. *Neovectria radiculicola*: (A) periteca formada na superfície do meio de Gelose de Folha de Craveiro (CLA) através do cruzamento entre os isolados Cy1 e Cy68 (x100); (B) periteca aberta na qual se podem observar ascos e ascósporos (x250); (C) ascos contendo ascósporos (x400).

As características biométricas das peritecas variaram entre 151 μ m e 220 μ m, com um valor médio de 188 μ m, para o comprimento e entre 133 μ m e 203 μ m, com um valor médio de 171 μ m, para a largura. Relativamente aos ascos, as características biométricas variaram entre 41 μ m e 64 μ m, com um valor médio de 56 μ m para o comprimento e entre 6 μ m e 13 μ m, com um valor médio de 10 μ m, para a largura. Finalmente, no que respeita aos ascósporos, as características biométricas variaram entre 9 μ m e 16 μ m, com um valor médio de 12 μ m para o comprimento e entre 3 μ m e 7 μ m, com um valor médio de 5 μ m, para a largura (Quadro 3).

Quadro 3. Características biométricas das peritecas, ascos, e ascósporos de *Neonectria radiculicola* em meio de Gelose de Folha de Craveiro (CLA) após cinco meses de incubação, à temperatura de 6°C e sob acção de radiação emitida por lâmpadas tubulares Ultra-Violeta Próximo (NUV), ao fim de cinco meses. Cy, isolados de *Cylindrocarpon destructans*

Cruzamentos	Peritecas (µm)		Ascospores (µm)		Ascósporos (µm)	
	comprimento	largura	comprimento	largura	comprimento	largura
Cy1/Cy68	151	133	41	8	11	3
Cy16/Cy68	151	133	41	7	10	3
Cy18/Cy68	151	133	43	9	13	5
Cy19/Cy36	162	145	53	10	9	5
Cy19/Cy68	162	145	52	6	10	5
Cy21/Cy24	168	151	52	8	14	6
Cy21/Cy76	186	168	56	8	14	5
Cy24/Cy111	191	174	60	11	12	7
Cy27/Cy36	191	174	61	9	11	5
Cy27/Cy111	203	186	61	11	10	7
Cy29/Cy68	203	186	63	11	14	5
Cy36/Cy76	209	191	63	11	12	6
Cy36/Cy111	215	197	64	11	14	6
Cy68/Cy76	220	203	63	13	14	5
Cy68/Cy111	220	203	64	9	10	3
Cy76/Cy107	220	203	63	13	14	5
Cy76/Cy111	191	174	60	13	16	6
Valores						
minímo,médio e máximos*	(151)-188-(220)±26	(133)-171-(203)±26	(41)-56-(64)±8	(6)-10-(13)±2	(9)-12-(16)±2	(3)-5-(7) ±1

* - Os valores entre parêntesis correspondem aos valores mínimos e máximos, enquanto que o valor intermédio corresponde à média, ± desvio padrão.

Relativamente às dimensões das peritecas, ascos e ascósporos, referidas por Booth (1967), e de peritecas e ascósporos, mencionadas por Larignon (1999), a maioria dos valores observados não se afasta apreciavelmente dos intervalos por eles referidos. É de salientar que a variação observada na biometria das peritecas pode dever-se ao facto de as mesmas terem sido produzidas *in vitro*, sendo de admitir que as dimensões referidas pelos diferentes autores tenham sido avaliadas a partir de peritecas formadas em material vegetal, visto não ser mencionado qualquer meio de cultura. As dimensões dos ascos aproximam-se das referenciadas por Booth (1967) e por Samuels & Brayford (1990), enquanto que as dos ascósporos revelam valores superiores para o comprimento máximo e também para a largura máxima (Quadro 4).

Quadro 4. Características biométricas de *Neonectria radiculicola*.

Autores	Peritecas (µm)	Ascospores (µm)	Ascósporos (µm)
Gerlach e Nilsson, 1963	-	-	8-13 × 2,2-4,4
Booth, 1967	170-350 × 150-320	53-83 × 4,5-10	10-13 × 3-3,5
Samuels & Brayford, 1990	-	40-60 × 7-8	-
Larignon, 1999	170-350 × 150-321	-	10-13 × 3-3,5
Presente estudo	151-220 × 133-203	41-64 × 6-13	9-16 × 3-7

Nenhum isolado de *C. destructans* se revelou sexualmente auto-compatível, indiciando um comportamento heterotático para a espécie, o que está de acordo com Samuels & Brayford (1990) e contradiz Ahn & Lee (2001). Para a maioria dos cruzamentos férteis, não foi possível estabelecer correlação entre origem geográfica do material vegetal, porta-enxerto/casta, data de isolamento. Assim, a título de exemplo, o isolado Cy68, obtido do porta-enxerto 99R, no Pó (Bombarral), originou cruzamentos férteis com isolados de Torres Vedras (Cy1), Almeirim (Cy18), Gouveia (Cy19), Régua (Cy29) e S. João da Pesqueira (Cy111), mas não com o isolado Cy24, igualmente colhido no Pó (Bombarral). No que se refere ao porta-enxerto, os isolados tanto foram obtidos de 99R (ex., Cy1, Cy68, Cy111), como de SO4 (Cy18), 1103P (Cy19) ou 110R (Cy29). Quanto à data de obtenção dos isolados, ela variou entre 1994 (Cy1) e 1999 (Cy68, Cy111). Aparentemente, contradizendo esta não correlação, surgem os isolados Cy68 e Cy76, de cujo cruzamento se obtiveram peritecas férteis. Ambos os isolados foram colhidos no ano de 1999, do porta-enxerto 99R, no Pó (Bombarral), o que perspectiva potencialidades para a diferenciação, em condições naturais, do estado teleomórfico de *C. destructans*. O alargamento deste estudo a um maior número de isolados, a isolados obtidos de uma mesma vinha e/ou viveiro, em data idêntica, revela-se essencial, para que possam ser extraídas conclusões quanto à ocorrência natural (ou potencial) do fungo, no seu estado sexuado. A verificar-se tal possibilidade, será de admitir que peritecas e ascósporos possam assegurar (a par de clamidósporos e conídios do anamorfo, respectivamente) determinados estádios do ciclo da doença, nomeadamente a sobrevivência do fungo (peritecas) e a produção de inóculo responsável por infecções primárias (ascósporos). O conhecimento profundo do ciclo da doença é essencial para que se possam adoptar os meios de protecção adequados no controlo desta doença, na óptica da Protecção Integrada.

Face ao elevado interesse de que se revestem os estudos sobre o pé-negro da videira para o sector vitivinícola em Portugal, e considerando as principais conclusões retiradas deste estudo relativamente ao teleomorfo e as questões que nele ficaram por esclarecer, salientam-se algumas prioridades e linhas de trabalho futuro: i) optimizar as condições de obtenção do estado teleomórfico de *C. destructans*, de forma a diminuir o tempo de obtenção de peritecas e facilitar os estudos subsequentes, com vista a indagar o comportamento sexual do fungo; ii) alargar os estudos de comportamento sexual aos restantes isolados da colecção nacional de *C. destructans* e a novos isolados que cumpram os critérios anteriormente definidos (idêntica proveniência e idade), com vista ao esclarecimento do ciclo da doença no país.

Referências Bibliográficas

- Ahn, I.P. & Lee, Y.-H. 2001. A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14: 496-507.
- Armengol, J., Vicent, A., Torne, L., García-Figueres, F. & Garcia-Jiménez, J. 2001. Fungi associated with esca and grapevine decline in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia mediterranea*, 40: S325-S329.
- Booth, C. 1966. The genus *Cylindrocarpon*. *Mycological papers* 104: 1-54.
- Booth, C. 1967. *Nectria radicola*. *Descriptions of Plant Pathogenic Fungi and Bacteria* nº 148. Commonwealth Mycological Institute. Kew.
- Boubals, D. 1994. Etat actuel des problèmes posés par les maladies du bois entraînant des dépérissements de la vigne: eutypiose, esca, bois noir. *Progrès Agricole et Viticole* 111: 125-131.

- Brayford, D. 1992. *Cylindrocarpon*. In Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. L. L. Singleton, J.D. Mihail & C.M. Rush (eds.). American Phytopathological Society, St. Paul, 103-106.
- Crous, P. W., Alfenas, A. & Wingfield, M.J. 1993. *Calonectria scoparia* and *Calonectria morganii* sp. nov., and variation among isolates of their *Cylindrocladium anamorphs*. Mycological Research, 97: 701-708.
- Fourie, P.H. & Halleen, F. 2001. Field and diagnostic observations of grapevine decline in South Africa. In Proceedings 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia. Universidade de Évora, Évora, 17-20 Setembro, 288-290.
- Galet, P. 1995. Précis de Pathologie Viticole. 2^{ème} édition. Imprimerie JF, Montpellier, 264 pp.
- Gerlach, W. & Nilsson, L. 1963. Beiträge zur kenntnis der gattung *Cylindrocarpon* Wr. V. *Nectria radiculicola* n. sp., die bisher unbekannte Hauptfruchtform von *Cylindrocarpon radiculicola* Wr. Phytopathologische Zeitschrift, 48: 251 (cit in Booth, 1966).
- Larignon, P. 1999. Black foot disease in France. In Black Goo: Symptoms and Occurrence of Grape Declines - IAS/ICGTD Proceedings 1998. L. Morton (eds.). International Ampelography Society, Fort Valley, Virginia, 89-90.
- Maluta, D. & Larignon, P. 1991. Pied-noir: mieux vaut prévenir. Viticulture, 11: 71-72.
- Mantiri, F.R., Samuels, G.J., Rahe, J.E. & Honda, B.M. 2001. Phylogenetic relationships in *Neonectria* species having *Cylindrocarpon* anamorphs inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. Canadian Journal of Botany, 79: 334-340.
- Oliveira, H., Nascimento, T. & Rego, M.C. 1998. Crown gall and *Cylindrocarpon* black-foot disease of grapevine in Portugal. In Proceedings of the 19th Internacional Geisenheim Workshop on Grapevine Grafting, 1998. Geisenheim, 2-4 July, 23-34.
- Rego, M.C.F. 1994. Nova e grave doença da videira em Portugal. Agente responsável: *Cylindrocarpon destructans* (Zins.) Scholten. Publicação do Laboratório de Patologia Vegetal "Veríssimo de Almeida" 67: 1-4.
- Rego, M.C., Oliveira, H., Carvalho, A. & Phillips, A. 2000. Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. Phytopathologia mediterranea, 39: 76-79.
- Rossmann, A., Samuels, G.J.; Rogerson, C.T. & Lowen, R. 1999. Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). Studies in Mycology, 42: 1-248.
- Rumbos, I. & Rumbou, A. 2001. Fungi associated with esca and young grapevine decline in Greece. Phytopathologia mediterranea, 40: S330-S335.
- Samuels, G.J. & Brayford, D. 1990. Variation in *Nectria radiculicola* and its anamorph, *Cylindrocarpon destructans*. Mycological Research, 94: 433-442.
- Scheck, H.J., Vasquez, S.J., Fogle, D. & Gubler, W.D. 1998. Grape growers report losses to black-foot and grapevine decline. California Agriculture, 52: 19-23.
- Schoch, C.L., Crous, P.W., Wingfield, M.J. & Wingfield, B.D. 2000. Phylogeny of *Calonectria* and selected hypocrealean genera with cylindrical macroconidia. Studies in Mycology, 45: 45-62.
- Tio, M., Burgess, L.W., Nelson, P.E. & Toussoun, T.A. 1977. Techniques for the isolation, culture and preservation of the *Fusaria*. Australian Plant Pathology Society Newsletter, 6: 11-13 (cit in Brayford, 1992).